

APOPTOZA ȘI CONCEPTUL DE MOARTE CELULARĂ ÎN CURSUL DEZVOLTĂRII, ÎN PATOLOGIE ȘI TERAPIE

II. Transducția semnalelor de moarte celulară

V.A. Voicu*, M.E. Hinescu**, R. Alexandrescu***, A. Vărzaru***

1. Factorii de supraviețuire sau moartea prin lipsa de comunicare
2. „Semnale de viață” și „semnale de moarte”. Apoptoza din perspectiva receptorilor
3. Transducția semnalului de moarte celulară
4. Comunicarea intercelulară și apoptoza
5. Gene ale vieții și gene ale morții: controlul genetic al apoptozei
6. Bibliografie

REZUMAT

Al doilea articol din această serie face o trecere în revistă a datelor experimentale referitoare la transducția mesajelor, în cursul morții celulare prin apoptoză. Sunt prezentate mai amplu căile de semnalizare și structurile implicate în controlul genetic al acestui tip de moarte celulară. Înțelegerea unor detalii de natură moleculară ale acestor mecanisme ar permite designul unor noi strategii terapeutice, orientate spre inducerea sau blocarea morții celulare, în scopuri medicale. Datele prezentate arată că, în ciuda progreselor remarcabile înregistrate, imaginea noastră de ansamblu asupra morții celulare prin apoptoză este departe de a fi completă.

Cuvinte cheie: apoptoză, căi de semnalizare, *p53*, *bcl-2*

ABSTRACT

Apoptosis and all death concept in development process, in pathology and therapy

In this article, we review some of the experimental evidence concerning signal transduction of apoptotic cell death. A more detailed perspective is presented on signalling pathways and genes involved in the control of apoptosis. A molecular understanding of these mechanisms may allow the design of therapeutic strategies oriented to either induce or block cell death in medical purposes. The recent progress in understanding the processes reviewed here show that, despite the significant advances, our picture of apoptotic cell death is far from complete.

Key words: apoptosis, signalling pathways, *p53*, *bcl-2*

1. Factorii de supraviețuire sau moartea prin lipsa de comunicare

Mecanismele de control, precum și etapele parcurse în cursul proliferării celulare normale sunt cunoscute tot mai în detaliu (11-13, 15, 24, 29, 38). Dimpotrivă, cunoștințele asupra mecanismelor ce guvernează echilibrul dintre supraviețuire și moartea celulară sunt în curs de acumulare. Au fost elaborate mai multe teorii asupra supraviețuirii celulelor (1). Punctul de vedere „extrem” a fost formulat prin enunțarea ideii că, în absența unor semnale „de supraviețuire”, conduita „implicită” a celulelor ar fi sinuciderea. Raff și col. au arătat că, cel puțin pentru unele tipuri de celule, dependența de mesaje de „supraviețuire” este un fapt cert. Celulele în cauză ar fi: neuronii în cursul dezvoltării S.N.C., celulele cortexului suprarenalei, celule ale sistemului hematopoietic, celulele epiteliale prostateice (1, 32).

Dependența de „mesaje de supraviețuire” ar putea, teoretic, reprezenta o modalitate de a elimina celule ajunse (fie în cursul dezvoltării, fie în condiții patologice) la distanță de locul lor firesc în organism și, implicit, la distanță de sursa mesajelor lor de supraviețuire. Condiția ce s-ar impune,

pentru o astfel de ipoteză, ar fi aceea că ar fi necesar ca natura mesajelor de supraviețuire să fie semnificativ diferită, în funcție de tipul de țesut. Din aceeași perspectivă, s-ar putea explica (alături de alte mecanisme) și latența dintre dezvoltarea unei tumori maligne și momentul apariției metastazelor. În această ipoteză, celulele metastatice fie își pot bloca mecanismele de inducere a apoptozei, fie își dezvoltă, pe cont propriu, sinteza factorilor de supraviețuire necesari.

Noutatea acestui tip de abordare constă în ideea că fenomenul de dependență de factori de supraviețuire **sintetizați de alte celule** ar putea fi un fenomen mai general, ubicuitar chiar, cel puțin pentru organismele eucariote.

Derivând din această ipoteză, o altă speculație, pur teoretică deocamdată, este aceea că una dintre modalitățile de menținere a echilibrului dintre numărul de celule ce proliferază și numărul celor ce sunt distruse ar putea fi **competiția pentru semnale de supraviețuire**. În plus, acest mecanism, dacă ar fi într-adevăr operant, ar implica o selecție „naturală” a celulelor. Vor supraviețui numai celulele echipate cu receptori și căi de semnalizare intacte funcțional.

Dincolo de ipoteze, există dovezi experimentale ce par să susțină posibilitatea acestui tip de *moarte celulară prin lipsă*

*Prof. Dr. Victor A. Voicu - șeful Catedrei de Toxicologie Clinică, U.M.F. „Carol Davila”

**Dr. M.E. Hinescu, - Catedra de Histologie și Biologie celulară, U.M.F. „Carol Davila”; - Centrul de cercetări științifice medico-militare

*** Dr. R. Alexandrescu, cerc. st. A. Varzaru, Centrul de cercetări științifice medico-militare

de comunicare. Studiul efectuat de Boudreau și col. (7) a examinat rolul semnalelor elaborate la nivelul matricei extracelulare în supraviețuirea celulelor epiteliale din glanda mamară. Rezultatele acestui grup sugerează că structura tridimensională a matricei extracelulare și mesajele transmise de aceasta către celulă, prin intermediul receptorilor de tip integrine, participă la menținerea stării de diferențiere a celulelor epiteliale, și previne apoptoza. Dimpotrivă, degradarea proteolitică (de către metaloproteineze) a matricei extracelulare (survenită în cursul involuției glandei mamare) induce creșterea expresiei unei gene ce codifică pentru o enzimă-cheie în declanșarea apoptozei: ICE („interleukin-1b converting enzyme”: enzima de conversie a interleukinei 1b).

2. „Semnale de viață” și „semnale de moarte”. Apoptoza din perspectiva receptorilor

Mecanismele prin care celulele mențin sub control componentele programului de autodistrucție, înscris genetic, sunt complexe. Pentru moment, membrana celulară pare să fie „agentul” de legătură ce recepționează mesajele care pot duce la luarea unor decizii „de viață și de moarte” (10, 17, 25, 27, 31, 36).

Același tip de molecule-semnal poate fi purtătorul unei „sentințe” sau al unei „grațieri”. În figura 1 sunt reprezentate o parte dintre receptorii membranari ce pot participa la inițierea apoptozei: TNFR-1, CD95 (Fas sau APO-1) și receptorul DR-3, precum și căile de semnalizare cu care acești receptori sunt cuplați. Trebuie subliniat că aceeași moleculă - TNF („tumor necrosis factor”) - poate activa un al doilea tip de receptor (TNFR-2). Legarea de acest tip de receptor poate determina inițierea unei secvențe de reacții biochimice ce se finalizează cu proliferarea celulară (cel puțin pentru timocite) sau cu activarea factorului nuclear kB (NF-kB) (5). Acesta din urmă poate modula expresia unor variate gene și genera unele din aspectele complexe ale răspunsului celular la TNF (9).

3. Transducția semnalului de moarte celulară

Informațiile obținute până în prezent pe organisme inferioare - nematodul *Caenorhabditis elegans* și insecte din specia *Drosophila* - au demonstrat faptul că, cel puțin în parte, mecanismele genetice ale programului intrinsec al sinuciderii celulare au fost conservate, în evoluție, de la aceste specii și până la vertebrate. Rezultatele comunicate în ultimii câțiva ani au arătat că s-a profitat din plin de avantajele oferite de oportunitatea de a studia fenomenul morții celulare la aceste organisme, cu ajutorul unor modele experimentale mai accesibile și cu mai puține necunoscute (este cunoscut, de exemplu, numărul exact al celulelor dintr-un organism adult la nematodul *Caenorhabditis elegans*, iar genomul său va fi, probabil în 1998, în întregime cartografiat) (18). Pentru comparație, trebuie menționat că se estimează ca „Proiectul genomului uman” să fie finalizat în anul 2005 (au fost cartografiate circa 16.000 din totalul, estimat la 50.000 - 100.000 de gene umane) (35). Astfel, rezultate sau ipoteze variate au putut fi inițial testate pe aceste organisme și, ulterior, doar verificate sau nuanțate pe organisme mai evaluate sau pe celule umane. În figura 1 sunt prezentate și căile de semnalizare intracelulară ce pot induce activarea

programului de moarte celulară ce poartă trăsăturile biochimice și morfologice caracteristice apoptozei. Deși inițial s-a crezut că proteinele purtătoare ale unui „domeniu al morții” ar fi strict conectate cu căile de semnalizare ce induc apoptoza, ulterior s-a sugerat că aceste domenii structurale ar fi, mai degrabă, module ale interacțiunii tip „proteină-proteină”, decât substructuri specializate în transducția semnalului de moarte. (5)

ICE și caspazele. Din figura 1 reiese că activarea caspazelor (enzime înrudite cu enzima ICE) reprezintă o adevărată plăcă turnantă în transducția semnalului de moarte celulară. Descoperirea omologiei structurale marcate între enzima ced-3 (*Caenorhabditis elegans* death) și ICE (interleukin 1b converting enzyme) - precedată de precizarea rolului ced-3 la nematod - a dus la evaluarea ICE ca enzimă implicată în apoptoză, la vertebrate. Creșterea expresiei genei pentru ICE, în variate tipuri de celule de mamifer, s-a constatat a fi urmată de o accentuată intensificare a apoptozei în aceste țesuturi. (41,42). Ulterior, s-au identificat izoforme ale enzimei ICE precum și omologi ai acestei enzime: nedd (omologul său la om a fost denumit Ich-1), mch2, ICE-LAP3, TX/ICH-2/ICERel-II și ICERel-III. A devenit necesară o clasificare și elaborarea unor criterii de denumire a acestor enzime. Numele atribuit familiei a fost cel de *caspaze* (de la cistein-aspargat proteaze), iar diferitele subfamilii, individualizate pe baza asemănărilor de structură; fiecare dintre cele 10 enzime - identificate prin hibridizare încrucișată cu ADN complementar ICE, urmată de căutarea într-o bancă genomică de date (de proveniență umană) - a fost identificată printr-un sufix numeric. În figura 2 este prezentată o adaptare a clasificărilor propuse de Alnemiri și col. (2) și preluată de Nagata (26). Caspazele 2, 4, 5 și 7 sunt capabile să inducă moartea celulară, atunci când sunt exprimate în exces, în celule de mamifer, iar caspazele 6 și 3, dacă sunt exprimate în exces, în celule ale insectelor. (26)

Asupra țintelor moleculare ale cascadei enzimatică declanșate de activarea caspazelor datele din literatură sunt mai puțin abundente. Se poate consemna, mai degrabă un inventar al unor molecule, care pot participa la generarea modificărilor biochimice și morfologice caracteristice apoptozei. „Disecția” farmacologică a secvenței lor de activare, precum și precizarea acelor proprietăți ale acestor molecule (cu multiple efecte) implicate în apoptoză sunt la început.

După cum reiese din figura 1, printre aceste ținte moleculare ale caspazelor se află: **proteinele Rho-GDI** („Ras Homologue-guanine nucleotide dissociation inhibition”), polimeraza poli-ADP-ribozei și alte molecule, cu rol în producerea modificărilor morfologice ce însoțesc apoptoza (actina, de exemplu). Rolul proteinelor Rho-GDI este unul complex, interacțiunea lor cu alte proteine din aceeași familie (ce include circa 50 de protein-GTPaze monomerică înrudite cu *Ras*) putând determina reorganizări ale componentei actinice a citoscheletului celular, ca răspuns la anumiți stimuli (28).

La realizarea acestor remanieri citoscheletale pot participa și serin-treonin-kinaze de tipul **PAK** („p21-activated kinase”).

Unul dintre evenimentele inițiale în cursul derulării programului de apoptoză într-o celulă este exportul de fosfatidilcolină, în foia externă a bistratului lipidic membranar. Alterarea funcției PAK, indusă experimental, poate împiedica acest transfer al fosfatidilcolinei (34).

Descoperirea faptului că unele dintre procesele celulare sunt controlate de module alcătuite din protein-kinaze a fost considerată drept cel mai important progres înregistrat în cercetarea asupra semnalizării transmembranare, în ultimii 5 ani. (17).

Două observații sugerează că printre mecanismele de control ale apoptozei s-ar putea număra astfel de module de protein-kinaze.

Prima observație este aceea că activarea protein-kinazei B (denumită și Akt, după numele genei ce a permis identificarea ei) reprezintă o verigă într-un astfel de lanț al activării unor protein-kinaze. Se pare că mecanismul prin care IGF-1 („insulin growth like factor-1“) poate proteja

celele neuronale de stimuli ce induc apoptoza, este legat de participarea acestei protein-kinaze (Akt). În plus, la această cale de semnalizare participă și fosfoinozitolid-3-kinazele. (17).

O a doua observație sugerează că fluxul de informație al mecanismelor morții celulare ar putea include și o cale ce implică participarea cascadelor activate de compuși cu potențial mitogen (cascada MAP-K, „mitogen-activated protein-kinase“) (19). Implicarea unor astfel de căi de

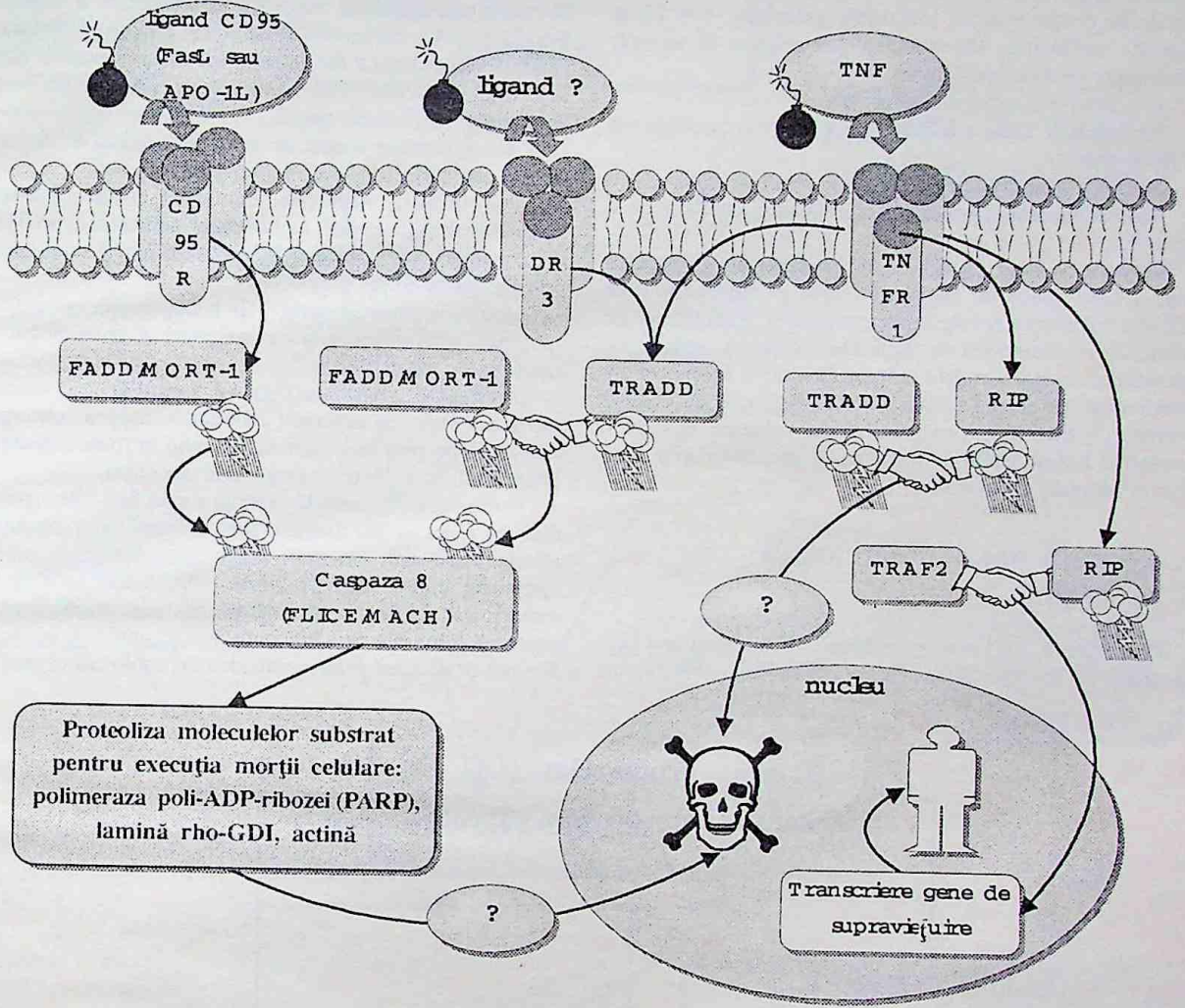


Fig. 1. Reprezentarea schematică a asemănarilor și deosebirilor între căile de semnalizare controlate de cele trei tipuri de receptori membranari ce pot transmite un semnal intracelular finalizat cu moartea celulară. Cuplarea unui ligand cu receptorii specifici (ligand neidentificat încă pentru receptorul DR-3, denumit astfel pornind de la „Death Receptor“) este urmată de trimerizarea sau oligomerizarea receptorului. Această formă a receptorului poate atașa variate molecule adaptoare, purtătoare ale unui „domeniu al morții“ („death domain“, termen introdus de Tartaglia în 1993) (39). Atunci când au un rol direct efector în generarea morții celulare, aceste domenii sunt notate în literatură cu numele DED („Dead Effector Domain“) Moleculele adaptoare cunoscute în prezent sunt: FADD (Fas-Associating Protein with Death Domain), denumită și MORT-1; TRADD (TNFR1-Associated Death Domain Protein), al cărui domeniu al morții nu este considerat direct efector; domeniile morții din cele două molecule, FADD și TRADD, pot însă interacționa între ele; RIP (Receptor Interacting Protein) este o serin/treonin-kinază purtătoare a unui domeniu al morții ce poate interacționa cu TRADD. Au fost descrise două căi de semnalizare finalizate cu inițierea apoptozei : a) activarea caspazei 8, fie prin intermediul moleculei FADD, fie prin cooperarea FADD-TRADD; b) activarea caspazei 2, prin intermediul moleculei RIP și o moleculă adaptoare (nereprezentată în figură) denumită RAIDD (RIP-Associated Ich-1/CED-3 Homologous Protein with Death Domain). Această ultimă cale urmează a fi susținută de dovezi experimentale (insuficiente până în prezent). FLICE (FADD-like ICE) și MACH-1 (MORT1-Associated Ced-3 Homologue) sunt numele anterioare ale caspazei (cistein-aspata protează) denumită și ICE (Interleukin-1b Converting Enzyme), enzimă ce, în urma activării, va genera compuși ce vor determina modificări biochimice și morfologice, caracteristice apoptozei. Rho-GDI = Ras homologue - Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor (explicații în text). TRAF = TNF Receptor Associated Factor.

semnalizare (Akt și, respectiv, MAP-K), este încă în curs de evaluare.

Granzimele și perforina. Tabloul căilor de semnalizare prezentat în figura 1 este departe de a fi complet. Există date care arată că aceste căi de semnalizare pot fi modulate prin intervenție la diferite niveluri. Activarea cascadei enzimatice a caspazelor poate fi inițiată, spre exemplu, în celulele țintă ale limfocitelor citotoxice, precum și în cele ale celulelor NK („natural killer“), prin eliberarea, prin exocitoză, a unor granule ce conțin enzime (denumite granzime: A și B) și, respectiv perforină. Mecanismul de acțiune al acestor componente se derulează astfel:

- exocitoza din celulele limfocitare;
- formarea de către perforină a unor pori în membranele celulelor țintă;
- trecerea granzimelor în citosolul celulelor țintă;
- activarea prin proteoliză a cascadei enzimatice a caspazelor.

Merită observat faptul că modificări citoplasmice caracteristice apoptozei pot fi induse și în celule din care nucleul a fost extras. Aceste celule pot rămâne active fiziologic o perioadă considerabilă de timp. De asemenea, alterări ale materialului nuclear similare cu cele din cursul apoptozei pot fi evidențiate pe nuclei izolați. Aceste observații au condus la ideea că diferitele compartimente celulare posedă o autonomie remarcabilă, în inițierea și/sau derularea unor procese asociate cu apoptoza. (37)

4. Comunicarea intercelulară și apoptoza

Până recent, participarea comunicării intercelulare prin joncțiuni de tip gap la modularea diferitelor răspunsuri

celulare a fost, în mare parte, ignorată. În figura 3 am schematizat căile transferului de informație între celulele aflate în contact și/sau la distanță. Schematizarea încearcă să țină cont de tipurile endocrină, paracrină și autocrină ale comunicării prin molecule-semnal cât și de caracteristicile comunicării prin neuromediatori.

Pot joncțiunile gap, acest tip de „telefon celular“ (termen utilizat de J.P. Resel la simpozionul „Comunicarea celulară în cursul creșterii controlate și necontrolate“, în anul 1989, la reuniunea anuală a Societății de cercetare a radiațiilor, Seattle S.U.A.) transmite mesaje de moarte ? Trosko și Goldman au examinat datele experimentale disponibile asupra unei astfel de ipoteze. (40). Rezultatele unui astfel de demers ar putea fi sumarizate astfel:

- în numeroase forme de neoplazie există o alterare a comunicării prin joncțiuni de tip gap;
- promotorii tumorali de tipul TPA (2-O-tetradecanoil-forbol-13 acetat), fenobarbital, activatori ai proliferării peroxizomilor pot inhiba atât apoptoza cât și comunicarea prin joncțiuni de tip gap;
- retinoizii, dexametazona, TGF-b, compuși ce pot amplifica apoptoza, sunt dovediți și ca activatori ai comunicării prin joncțiuni de tip gap.

De aceea, acești autori au postulat că, teoretic, medicamentele cu potențial modulator asupra comunicării intercelulare prin joncțiuni de tip gap ar putea modula și programul de moarte celulară prin apoptoza.

Unele indicii în această privință există deja. Oncogene de tipul *raf* și *ras* au fost asociate atât cu diminuarea comunicării intercelulare prin joncțiuni de tip gap, cât și cu inhibiția apoptozei induse prin iradiere (40). A fost demonstrată experimental, de asemenea, capacitatea unor gene ale expresiei tumorale de a influența mecanismele de transcriere a genei ce codifică pentru conexina 26, moleculă ce participă

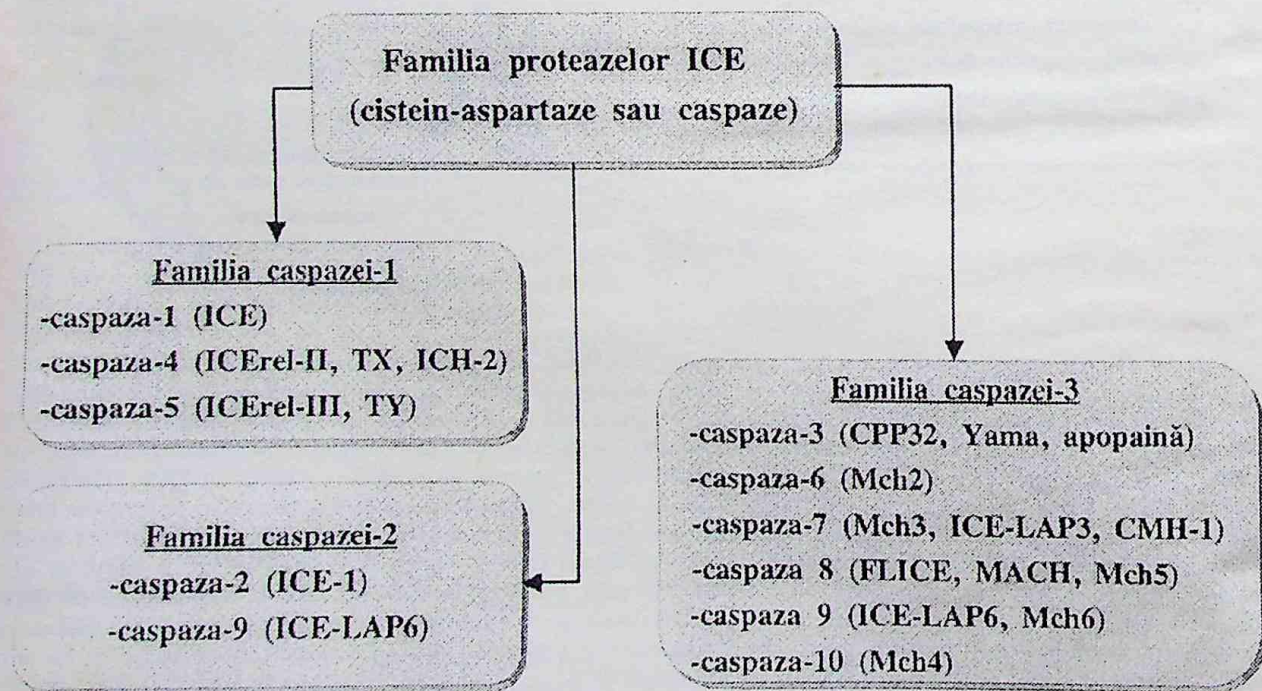
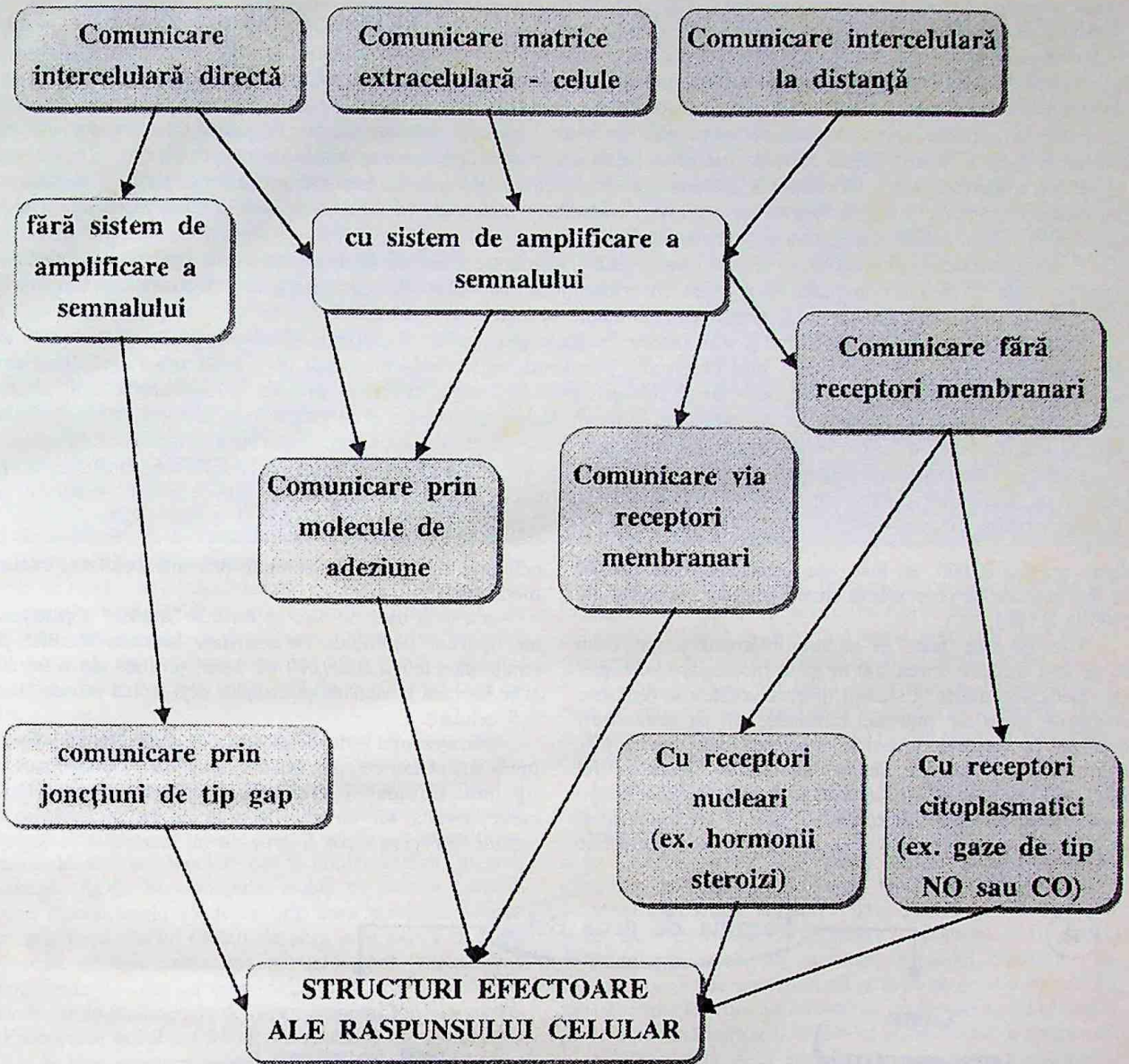


Fig. 2. Familia cistein-aspartazelor (caspaze), enzime denumite generic anterior cu numele primului reprezentant (ICE, „interleukin1b converting enzyme“), grupate pe baza criteriilor de omologie structurală. Alnemri (2) și Nagata (26) subliniază oportunitatea schimbării denumirilor acestor enzime, adesea greu de asociat cu apartenența la aceeași familie (denumirile sinonime sunt trecute în figură în paranteze). Este propus un singur nume, acela de caspaze (nume ce trimite la un aspect funcțional al acestor enzime).



la realizarea structurii hexamerice în unele joncțiuni de tip gap. (20)

Deși încă la stadiul de (atractive) ipoteze, aceste speculații referitoare la una din fațetele relației cauză-efect între transferul de informație prin joncțiuni de tip gap și apoptoză, merită a fi luate în considerație. Comunicarea anumitor semnale prin joncțiuni de tip gap ar putea fi, chiar dacă nu o condiție suficientă, una necesară pentru transmiterea semnalului de moarte în țesuturile „solide”. În același timp, s-ar putea explica - prin existența acestui mecanism „non-genotoxic” - progresia tumorală prin inhibiția apoptozei, ca urmare a atenuării / blocării transmise, pe această cale, a „semnalelor de moarte”.

5. Gene ale vieții și gene ale morții. Controlul genetic al apoptozei

Numele mare al abrevierilor utilizate în literatura internațională generează, uneori impresia - falsă - a unei inconsecvențe în ceea ce privește denumirea și/sau modul

de notare al numelor genelor. Explicația asupra acestei aparente inconsecvențe este dată de criteriile diferite utilizate pentru denumirea genelor, la diferite specii. Caseta 1 prezintă câteva dintre criteriile în uz asupra nomenclaturii genelor.

Gena p53 sau gena supresoare tumorală prezintă mutații la peste 50% din pacienții umani diagnosticați cu o formă oarecare de cancer (43). O astfel de informație poate constitui prilejul de a examina, sumar, modul în care se practică astăzi abordarea la scară moleculară a farmacologiei cancerului, precum și a impactului pe care îl au, în prezent, progresele în domeniul biologiei moleculare și al informaticii asupra cercetării medicale. Merită, de asemenea, a fi remarcată poziția pe care o ocupă mecanismele corelate cu apoptoza, în această abordare.

Strategia utilizată în prezent de către National Institute of Health (N.I.H.) din S.U.A. în identificarea unor noi agenți antineoplazici include un screening preliminar, realizat cu ajutorul a trei baze (bănci) de date interconectate:

- una ce conține informații referitoare la structura compușilor (460.000 de molecule, ce pot fi analizate pe baza a 270.000.000 de „descriptori” ai unor aspecte de structură;

CASETA 1. REPERE ASUPRA NOMENCLATURII GENELOR (adaptare după ref.21)

Nu există încă reguli clar definite, care să fie general valabile pentru denumirea genelor și mutantelor tuturor speciilor. În plus, convențiile asupra denumirii genelor sunt destul de neomogene, pentru diferite specii de organisme. În general, se recomandă ca numele genelor, alelelor și genotipurile să fie notate cu *caractere italice*, iar fenotipurile cu caractere romane. De asemenea, se recomandă ca numele genelor mutante să nu fie notate cu caractere *italice*. Numeroase gene poartă (încă) numele dat primei mutante identificate, care a dus la descoperirea lor.

Pentru specia umană. Genotipurile (locusuri și alele) sunt notate cu caractere italice, iar fenotipurile și mutantele cu caractere romane. Numele locusurilor se scriu cu caractere majuscule (ex., BAX) iar alelele recesive cu litere mici (ex., *myc*). Cromozomii sunt notați cu cifre arabe.

Pentru șoarece. În nomenclatura acestor gene există următoarele diferențe (față de simbolurile pentru nomenclatura genelor umane): alelele dominante sunt scrise cu prima literă majusculă (ex., *Src*), iar genele recesive cu litere mici. Simbolul pentru locus este acela al primei gene mutante la locusul respectiv.

Pentru Drosophila melanogaster și alte insecte. Numele genelor la Drosophila, și cu precădere al acelor gene implicate în procesul de dezvoltare, sunt descriptive și, uneori, chiar neobișnuite sau cu o tentă umoristică (ex., *sev* = *sevenless*; *boss* = *bride of sevenless*; *sos* = *son of sevenless* etc.). Locusurile și alelele, precum și simbolurile sunt notate cu caractere italice iar fenotipurile cu caractere romane. Alelele dominante și fenotipurile sunt scrise cu majusculă inițială (ex., *Notch*), iar alelele recesive și fenotipurile sunt scrise cu litere mici. Cromozomii sunt notați cu cifre romane.

Pentru Caenorhabditis elegans (nematod). Locusurile și alelele sunt notate printr-un cod de trei litere, scris cu italice iar locusurile diferite ce au ecou asupra aceleiași funcții sunt notate cu sufixe numerale (ex. *ced-3* de la *Caenorhabditis elegans death*).

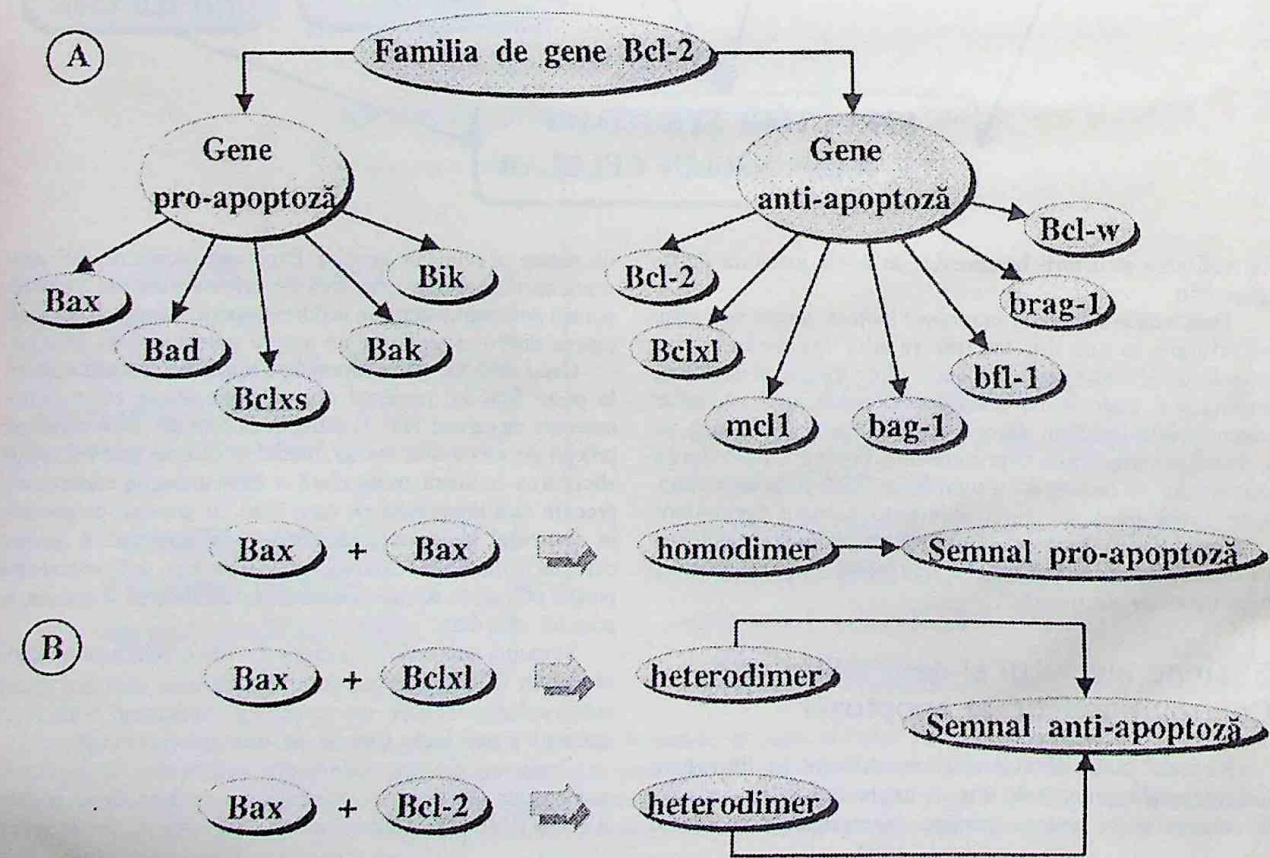
dintre acestea 60.000 au fost deja testate, pe toate cele 60 de linii celulare de proveniență umană utilizate începând din 1990 la N.I.H.);

- baza de date „țintă” ce include informații asupra celor 60 de linii celulare (circa 100 de ținte moleculare potențiale ale medicamentelor în studiu); printre acestea se regăsesc: oncogene, gene ale supresiei tumorale, *căi de semnalizare implicate în apoptoză* (exemple concrete: *indici pentru p53, H-Ras, K-Ras, N-Ras, Src, Rb, fosfatidil-inozitol-3 kinaza, Bcl-2, Bax, Bcl-X, etc*), *molecule implicate în controlul ciclului celular (integritatea punctelor de control G₁ și G₂) mecanisme de reparare a leziunilor ADN-ului, aspecte ale citoarhitecturii*

celulare, molecule ale semnalizării intracelulare, enzime metabolice;

- o a treia bază de date ce include “modele” (“patterns”) ale tipurilor potențiale de activitate farmacodinamică ale compușilor (circa 3.600.000 de valori posibile ale activității) și se bazează pe analiza compușilor deja testați pe cele 60 de linii celulare.

Aplicarea unui astfel de algoritm de analiză, pentru fiecare medicament sau compus evaluat, duce la o caracterizare de tip nou. Compusul evaluat dobândește o “amprentă” caracteristică, iar structurile chimice cu mecanisme de acțiune apropiate pot fi grupate în “baterii” (“clusters”),



astfel putându-se anticipa proprietăți asemănătoare sau identice, pentru un anume grup de compuși. În aceste condiții, elaborarea unor ipoteze de lucru pentru găsirea unor noi medicamente devine un proces extrem de complex, pierzând, în mare măsură, caracterul aleator.

Afirmația că nici o altă genă examinată până în prezent nu prezintă, în cursul bolii canceroase, un procent mai mare al mutațiilor decât gena *p53*, se bazează pe o astfel de analiză. Expresia acestei gene este foarte restrânsă în celulele normale, cu excepția perioadelor în care se produce sinteza ADN-ului. (30) Apariția unor leziuni al ADN-ului duce la creșterea semnificativă a transcrierii genei. Proteina *p53* este apoi translocată în nucleu. La acest nivel se leagă de ADN și modulează transcrierea unor gene: *p21/waf*, *mdm2*, *Bax* (23, 30).

Tumorile în care gena *p53* nu este funcțională sunt adeseori refractare la tratamentul chimioterapic sau la iradiere.

Apare evident, pe baza datelor prezentate, că identificarea unor modalități de acțiune asupra unor celule lipsite de gena *p53* ar deschide o nouă direcție în terapie. Datele prezentate la sfârșitul anului 1996 de grupul lui McCormick sunt incurajatoare în această direcție (6): a fost identificată o mutantă a unui adenovirus uman ce se poate replica selectiv în celule *p53*-deficiente, iar creșterea tumorală este semnificativ redusă în aceste condiții. Interesant, de asemenea, de observat că descoperirea acestei mutante s-a făcut pornind de la observația că o proteină a acestui adenovirus poate inactiva gena *p53*, în celulele în care ea există.

Genele familiei *bcl-2*. Numele familiei de gene vine de la numele liniei celulare în care a fost descoperită prima genă (**B cell lymphoma**), iar gruparea diferiților membri ai acestei familii se bazează pe criterii de omologie structurală. Proteinele codificate de genele acestei familii pot interacționa. Rezultatele acestor asocieri pot fi contradictorii, în plan funcțional. (fig.4). Nu s-au putut stabili cu precizie până în prezent mecanismele efectoare prin care produsul acestor gene determină efectul (3, 20). În plus, sunt indicii că unele din aceste proteine ar putea participa, prin mecanisme independente de cele ale apoptozei, la alte procese celulare, de exemplu, la fenomenele de regenerare neuronală axonală.

Proteinele *bcl-2* pot forma canale (pori) în membranele lipidice. În plus, aceste proteine pot inhiba proprietăți similare ale unor proteine înrudite: proteinele *Bax*.

Genă pentru proteina *bax* aparține familiei de gene *Bcl-2*. *Bax* reprezintă una dintre proteinele pro-apoptoză. Mai mult, spre deosebire de gena *p53* sau alte gene implicate în cancer, **singura funcție cunoscută pentru *BAX* este promovarea apoptozei** (33). Studiile efectuate pe linii celulare umane, asupra expresiei acestor gene în cursul progresiei tumorale, la nivelul colonului, au arătat că există forme clinice asociate cu mutații ce inactivează gena *BAX*, și, ca urmare, diminuează capacitatea de activare a unei căi de semnalizare pro-apoptoză, în care este implicată și gena *p53*. Pe de altă parte, în alte forme clinice tumorale colonice nu au fost decelate mutații nici la nivelul genelor *p53* și nici la al genelor *BAX*. Astfel, inactivarea acestor gene pare a nu fi singura cale de a bloca procesul de apoptoză. Acest fapt sugerează pe de o parte, că mecanismele prin care unele celule tumorale "scapă" inițierii apoptozei sunt altele decât calea *Bax - p53*, iar, pe de altă parte, că mecanismele de reglare a morții celulare sunt nu numai complexe, ci și redundante.

Mecanismul prin care *BAX* participă la realizarea apoptozei pare să fie legat de capacitatea acestor proteine de a forma

pori, după inserarea lor în membrane. Astfel, proteine *BAX* pot facilita efluxul pasiv de ioni și molecule cu dimensiuni mici, prin membranele în care ele sunt localizate. Prezența proteinelor *BAX* în membranele mitocondriale poate explica modificările potențialului transmembranar, survenite la nivelul mitocondriilor în stadiile inițiale ale apoptozei (4).

Bcl-x1 codifică pentru o proteină ce poate fi inserată în membrane sintetice și poate da naștere unor canale ionice, sensibile la pH, cu o cinetică a deschiderii complexă și conductanțe multiple (3, 8). Aceste proteine se regăsesc în alcătuirea membranelor mitocondriale și pot influența susceptibilitatea unor celule la semnale pro-apoptoză.

Presenilinelor (*PS*) 1 și 2 sunt gene ale căror mutații sunt asociate cu boala Alzheimer. Aceste gene au fost clonate și analizate structural, prezentând o omologie structurală de aproximativ 63% pe ansamblul moleculei și una de 95% atunci când s-au analizat numai domeniile transmembranare (16). Pentru moment, nu se cunosc alte consecințe ale mutațiilor apărute la nivelul acestor gene, în afara bolii Alzheimer. Recent, s-au prezentat date care arată că *PS-2* poate modula apoptoza. Nu este însă clar dacă pierderile de celule neuronale, în cursul bolii Alzheimer, sunt generate prin mecanisme corelate cu apoptoza.

Proteinele ***Bcr*** și ***c-Abl***, prezente în celulele normale, pot forma un complex, cu activitate *Abl*-kinazică și potențial oncogen. Celulele ce exprimă acest complex sunt foarte rezistente la inducerea apoptozei, în prezența unor stimuli ce, în mod normal, pot iniția acest proces. Experimentele care au încercat să stabilească o legătură cu genele *Bcl-2* au sugerat că *Abl*-kinaza își exercită efectul printr-un mecanism diferit, încă neprecizat (14).

Genele *myc* codifică pentru un factor al transcrierii ADN-ului care, se pare, poate induce atât proliferare necontrolată cât și apoptoză. Una dintre ipotezele referitoare la mecanismele susține că proteinele *myc* ar putea reprezenta elementul ce integrează **cele două mesaje necesare replicării, în cursul unei mitoze normale** : unul de trecere către mitoză și, un al doilea mesaj, de prevenire a apoptozei (31). Astfel, se poate specula că, într-un astfel de model, trecerea unei celule către proliferarea malignă ar presupune atât acumulări ale unor mutații care să favorizeze proliferarea, cât și unele care să prevină inițierea, la nivelul acelei clone, a apoptozei.

La *Drosophila*, gena ***reaper*** este inductoare a apoptozei. Nici mecanismul său de acțiune nu a fost identificat. Delețiile care includ această genă duc la apariția rezistenței față de apoptoza provocată de iradierea cu raze X. (37).

La nematodul *Caenorhabditis elegans* gena ***ced-3*** codifică pentru o proteină similară cu caspazele. De altfel, clasificarea acestui grup de enzime a avut ca punct de plecare descoperirea acestei gene la nematod.

În concluzie, mecanismele inițierii și derulării programului înscris genetic al morții celulare sunt complexe, variate și redundante. Multe din informațiile disponibile în prezent sunt constatări experimentale asupra capacității de a provoca moartea celulară, în cele mai variate linii celulare, dar, adeseori etapele intermediare, străbătute în urma activării de către diferite molecule-semnal (au fost evidențiate peste 100 de compuși capabili să inițieze apoptoză), rămân a fi stabile.

Modelele experimentale elaborate pe organisme inferioare (nematode și insecte) rămân în continuare instrumente deosebit de valoroase pentru cercetările în vederea evidențierii unor aspecte noi ale acestui proces.

Descifrarea disfuncționalităților procesului de moarte celulară, implicate în boala neoplazică, continuă să ocupe

locul cel mai însemnat în preocupările diferitelor grupuri angajate în cercetarea morții celulare prin apoptoză.

6. BIBLIOGRAFIE

1. ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. (EDS.), *Molecular Biology of the Cell*, third ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 1139-1190
2. ALNEMRI E.S., LIVINGSTON D.J., NICHOLSON D.W., SALVESEN G., THORNBERY N.A., WONG W.W., YUAN J., Human ICE/CED-3 protease nomenclature, *Cell*, 1996, 87:171
3. ANDERSON G.P., Bcl-2 related proteins, apoptosis and disease, *Trends Pharmacol. Sci.*, 1997, 18:51
4. ANTONSSON B., CONTI F., CLAVATTA A., MONTESSUIT S., LEWIS S., MARTINOU I., BERNASCONI L., BERNARD A., MEMROD J.J., MAZZEI G., MAUDRELL K., GAMBALÉ F., SADOL R., MARTINOU J.C., Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2, *Science*, 1997, 277:370-372
5. BAKER S.J., REDDY E.P., Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins, *Oncogene*, 1996, 12:1-9
6. BISCHOFF J.R., KIRN D.H., WILLIAMS A., HEISE C., HORN S., MUNA M., NG L., NYE J.A., SAMPSON-JOIANNE A., FATTAÏY A., MCCORMICK F., An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells, *Science*, 1996, 274: 373-376
7. BOUDREAU N., SYMPSON C.J., WERB Z., BISSEL M.J., Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix, *Science*, 1995, 267:891-893
8. BOXER P.A., BIGGE C.F., Mechanisms of neuronal cell injury / death and targets for drug intervention, *Drug. Discov. Today*, 1997, 2:219-228
9. CIFONE M.G., RONCAIOLI P., DE MARIA R., G. CAMARDA, SANTONI A., RUBERTI G., TESTI R., Multiple pathways originate at the Fas/APO-1 (CD95) receptor: sequential involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acidic sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal, *EMBO J.*, 1995, 14:5859-5868
10. CINNAIAN A.M., O'ROURKE K., YU G.-Y., LYONS R.H., GARG M., DUAN D.R., XING L., GENTZ R., NI J., DIXT V.M., Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95, *Science*, 1996, 274:990-992
11. EDGAR B.A., LEINER C.F., Developmental controls of cell cycle regulators: A fly's perspective, *Science*, 1996, 274: 1646-1651
12. EDMONSON D.G., ROTH S.Y., Chromatin and transcription, *FASEB J.*, 1996, 10:1173-1182
13. ELDEGE S.J., Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis, *Science*, 1996, 274:1664-1671
14. GREEN D.R., MCGAIHOUN A., MARTIN S.J., Regulation of apoptosis by oncogenes, *J. Cell. Biochem.*, 1996, 60:33-38
15. GRIFFITH D.A., JARVIS S.M., Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1286:153-181
16. HAASS C., Presenilins: Genes for life and death, *Neuron*, 1997, 18:687-690
17. HEMMINGS B.A., Akt signaling: Linking membrane events to life and death decisions, *Science*, 1997, 275:628-630
18. HODKIN J., PLASTERK H.A., WATERSON R.H., The nematode *Caenorhabditis elegans* and its genome, *Science*, 1995, 270:410-414
19. ICHIJO H., NISHIDA E., IRIE K., DLJKE P., SAITOH M., MORIGUCHI T., TAKAGI M., MATSUMOTO K., MIYAZONO K., GOTOH Y., Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways, *Science*, 1997, 275: 90-94
20. KARASAVVAS N., ERUKKULA R.K., BITTMAN R., LOCKSHIN R., HOCKENBERY D., ZAKERI Z., BCL-2 suppresses ceramide-induced cell killing, *Cell Death Diff.*, 1996, 3:149-151
21. KENDREW J. (ED.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Inc., Oxford, 1994, pp. 419-420
22. LEE S.W., TOMASETO., SAGER R., Positive selection of candidate tumor suppressor genes by subtractive hybridization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88:2825-2829
23. MILCZAREK G.J., MARTINEZ J., BOWDEN G.T., p53 phosphorylation: Biochemical and functional consequences, *Life Sci.*, 1997, 60:1-11
24. MINNICK D.T., KUNKEL T.A., DNA synthesis errors, mutators and cancer, *Cancer Survveys*, 1996, 274:1643-1645
25. NAGATA S., GOLDSTEIN P., The Fas death factor, *Science*, 1995, 267:1449-1456
26. NAGATA S., Apoptosis by death factor, *Cell*, 1997, 88:355-365
27. NAGATA S., Apoptosis regulated by death factor and its receptor: Fas ligand and Fas, *Phil. Trans R. Soc. Lond. B*, 1994, 345: 281-287
28. NARUMIYA S., The small GTPase Rho: Cellular functions and signal transduction, *J. Biochem.*, 1996, 120:215-228
29. NASMYTH K., Viewpoint: Putting cell cycle in order, *Science*, 1996, 274:1643-1645
30. POTTEN C.S., WILSON J.W., BOOTH C., Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium, *Stem Cells*, 1997, 15:82-93
31. PRITCHARD D.M., WATSON A.J.M., Apoptosis and gastrointestinal pharmacology, *Pharmacol. Ther.*, 1996, 72:149-169
32. RAFF M.C., Social controls on cell survival and cell death, *Nature*, 1992, 356:397-400
33. RAMPINO N., YAMAMOTO H., IONOV Y., LI Y., SAWAI H., REED J.C., PERUCHO M., Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype, *Science*, 1997, 275:967-969
34. RUDEL T., BOKOCII G.M., Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2, *Science*, 1997, 276:1571-1574
35. SCHULER G.D., BOGUSKI M.S., STEWART E.A. ET AL, A gene map of the human genome, *Science*, 1996, 274:540-546
36. SKOWRONSKI E.W., KOLESNICK R.N., GREEN D.R., Fas-mediated apoptosis and sphingomyelinase signal transduction: the role of ceramide as second messenger for apoptosis, *Cell Death Diff.* 1996, 3:171-176
37. STELLER H., Mechanisms and genes of cellular suicide, *Science*, 1995, 267:1445-1449
38. STILLMAN B., Cell cycle control of DNA replication, *Science*, 1996, 274:1659-1664
39. TARTAGLIA L.A., AYRES T.M., WONG G.H.W., GOEDDEL D.V., A novel domain within the 55kD TNF receptor signals cell death, *Cell*, 1993, 74:845-853
40. TROSKO J.E., GOODMAN J.I., Intercellular communication may facilitate apoptosis: Implication for tumor promotion, *Mol. Carcinogen.*, 1994, 11:8-12
41. UREN A.G., VAUX D.L., Molecular aspects of apoptosis, *Pharmacol. Ther.*, 1996, 72:37-50
42. VAUX D.L., STRASSER A., The molecular biology of apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93:2239-2244
43. WEINSTEIN J.N., MYERS T.G., O'CONNOR P.M. ET AL, An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer, *Science*, 1997, 275:343-349